

吉非替尼联合氟尿嘧啶对食道癌细胞增殖的抑制作用

王利平 符鹏程 张华 谢俊涛

摘要 目的:探讨表皮生长因子抑制剂吉非替尼与氟尿嘧啶单用及联用对食道癌细胞增殖的抑制作用。方法:采用 MTT 方法检测吉非替尼与氟尿嘧啶单用及其合用对食道癌细胞株 Eca-109 增殖的抑制作用。结果:吉非替尼随着给药浓度的增加和作用时间的延长而抑制作用增加;但是在 48、72 h 80 $\mu\text{g/mL}$ 与 40 $\mu\text{g/mL}$ 组间比较抑制率差异无显著性($P > 0.05$);氟尿嘧啶对食道癌的抑制作用同一浓度组在不同时间抑制率比较差异有显著性($P < 0.05$);同一时间不同浓度组抑制率比较差异有显著性($P < 0.05$);吉非替尼与氟尿嘧啶合用后在 24、48、72 h 对食道癌细胞抑制率均显著高于单用吉非替尼及氟尿嘧啶($P < 0.05$),合用后 48、72 h 协同作用 q 值均 > 0.85 。结论:吉非替尼与氟尿嘧啶对食道癌细胞抑制作用具有时间浓度依赖性,两者合用后作用明显增强。

关键词 食管肿瘤; 吉非替尼; 氟尿嘧啶

表皮生长因子(EGFR)在原发性食道癌中的表达高达 40%~70%;EGFR 表达与食道癌患者性别、年龄、病理类型、淋巴结侵犯程度等具有相关性;EGFR 高表达的患者具有预后较差的趋势,因此 EGFR 对食道癌患者有着重要的生物学意义^[1]。EGFR 的磷酸化导致激活了不同的信号传导通路,这些与肿瘤的进展和化疗、放疗的抵抗具有相关性^[2-3]。目前阻断 EGFR 通路的药物包括细胞膜外抗体西妥昔单抗,以及低分子阻断 EGFR 酪氨酸激酶的抑制剂吉非替尼和厄洛替尼。尽管这些抑制剂作为单药治疗食道癌作用有限^[4-5],但是也许作为化疗和放疗的增敏剂会使其更加有效^[6]。已有研究报道了 EGFR 抑制剂与放疗合用对食道癌抗肿瘤作用具有协同性^[7]。而关于此类药物与化疗合用对食道癌的疗效报道甚少,基于此,本文研究了吉非替尼与食道癌常用化疗药物氟尿嘧啶合用对食道癌细胞 Eca-109 的抗肿瘤效应,从而为临床提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 RPMI 1640 培养基(Gibco),小牛血清(兰州民海生物工程有限公司),胰蛋白酶(上海化学试剂公司),EDTA(汕头光华化学厂),MTT(Sigma),氟尿嘧啶由上海旭东海普药业有限公司生产,批号:090301,吉非替尼(易瑞沙)为阿斯利康产品,剂型为 250 mg/片,用 DMSO 配置为 20 mg/mL 的溶液,置于-20℃的冰箱中保存。用时常

温解冻后,用 RPMI 1640 稀释至所需浓度,并使 DMSO 的最终浓度不超过 0.1%,从而不影响细胞生长。

1.2 主要设备和仪器 超净工作台, Bio-Rad550 型博赛自动酶标仪(中国郑州赛博公司), CO₂ 培养箱(美国 NAPCO), LXJ-II 离心沉淀机(上海医用分析仪器厂),倒置相差显微镜(日本 OLYMPUS)。

1.3 细胞培养 人食管癌细胞株 Eca-109,购自中国科学院上海细胞生物研究所,由南方医院肿瘤生物实验室惠赠。培养条件:细胞培养于含 10%新生小牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 RPMI-1640 培养液中,置于 37℃、CO₂ 分压为 5%、湿度 85%的恒温培养箱中培养,每 3~4 d 传代一次,取对数生长期细胞进行实验。

1.4 MTT 法检测吉非替尼对食道癌细胞的杀伤效应 取对数生长期 Eca-109 细胞,调整细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,接种于 96 孔培养板,置 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养 24 h 后,吸去培养液。分为空白对照组、吉非替尼组、氟尿嘧啶组、氟尿嘧啶及吉非替尼合用组,每组每个浓度 4 个复孔。其中空白对照组只加入培养液 200 μL ;吉非替尼、氟尿嘧啶组加入含有不同药物浓度的培养液 200 μL ,使吉非替尼终浓度分别 5、10、20、40、80 $\mu\text{g/mL}$,氟尿嘧啶终浓度为 4、8、16、32、64 $\mu\text{g/mL}$;吉非替尼加氟尿嘧啶合用组为:5+4、10+8、20+16 $\mu\text{g/mL}$ 。继续培养 24、48、72 h 后,每孔加入 MTT 20 μL ,避光培养 4 h 后去培养液,每孔加入 DMSO 150 μL ,于振荡器上摇匀后于酶标仪上测 OD₅₇₀ 值,并按照以下公式计算细胞抑制率,细胞抑制率 = (实验组 OD₅₇₀ - 本底组 OD₅₇₀) / (空白对照组 OD₅₇₀ - 本底组

OD₅₇₀)。以上实验重复 3 次。采用协同作用 q 值判断吉非替尼与氟尿嘧啶联用的效果, q 值的计算公式为: $q = E_{AB}/(E_A + E_B - E_A \times E_B)$ 。式中 E_A 和 E_B 为各药单用抑制率, E_{AB} 为两药合用抑制率。 $q > 1.15$ 为协同作用, $0.85 \leq q \leq 1.15$ 为相加作用, $q < 0.85$ 为拮抗作用。

1.5 统计学处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据处理采用 SPSS13.0 统计软件,单因素方差分析组间比较,方差齐性多重比较均采用 LSD 检验,方差不齐通过对数转化为方差齐性的检验或者采用 Dunnett's T3 方法。析因分析用于药物浓度与时间对抑制率的交互作用分析,以及不同药物之间的交互作用。 $P < 0.05$ (双侧)表示差异有显著性。

2 结果

2.1 单药吉非替尼对食道癌细胞的抑制作用 经不同浓度的吉非替尼处理后,食道癌细胞的生长抑制率随着给药浓度的增加和作用时间的延长而提高;但是在 48、72 h 80 $\mu\text{g/mL}$ 与 40 $\mu\text{g/mL}$ 组间比较抑制率差异无显著性($P > 0.05$);其余各组在不同时间抑制率差异有显著性($P < 0.05$);时间与浓度间交互作用显著($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 单药氟尿嘧啶对食道癌细胞的抑制作用 如图 2 所示;经不同浓度的氟尿嘧啶处理后,食道癌细胞的生长抑制率随着给药浓度的增加和作用时间的延长而提高,具有时间浓度依赖性。同一浓度组在不同时间抑制率比较差异有显著性($P < 0.05$);同一时间不同浓度组抑制率比较差异有显著性($P < 0.05$);且时间与浓度间的交互作用显著($F = 42.77, P = 0.000$)。

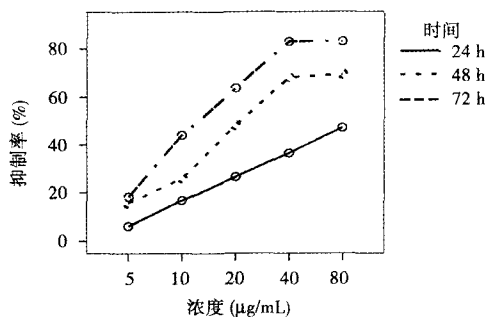


图 1 吉非替尼对 Eca-109 抑制率的影响

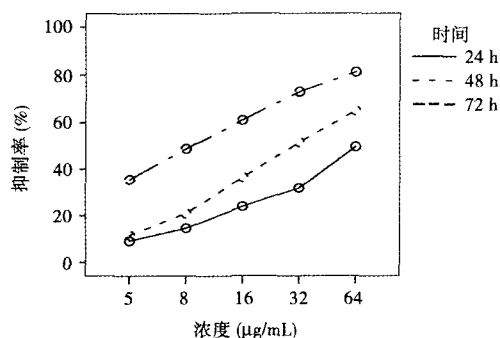


图 2 氟尿嘧啶对 Eca-109 抑制率的影响

2.3 吉非替尼与氟尿嘧啶合用对食道癌细胞的抑制作用 吉非替尼与氟尿嘧啶合用后在 24、48、72 h 对食道癌细胞抑制率均显著高于单用吉非替尼及氟尿嘧啶($P < 0.05$),合用组 72 h 抑制率达到最高,三个浓度组合抑制率分别为(35.27 ± 2.36)%, (65.29 ± 0.78)%, (75.14 ± 3.31)%。见表 1。

表 1 吉非替尼与氟尿嘧啶对人食道癌的抑制率

药物($\mu\text{g/mL}$)		时间(h)			F 值	P 值
吉非替尼	氟尿嘧啶	24	48	72	各时间点比较依次如下	
5	0	6.43 ± 1.39	14.7 ± 2.02	18.57 ± 1.62	31.50	0.000
0	4	9.56 ± 1.79	12.07 ± 2.09	30.12 ± 2.36	42.78	0.000
5	4	11.54 ± 1.68	21.47 ± 1.43	35.27 ± 2.36	119.38	0.000
10	0	17.35 ± 2.32	26.97 ± 1.78	45.34 ± 2.40	37.42	0.000
0	8	13.78 ± 1.94	20.17 ± 1.67	48.43 ± 0.78	569.06	0.000
10	8	20.98 ± 2.24	41.73 ± 1.54	65.29 ± 0.78	918.34	0.000
20	0	26.92 ± 2.43	47.70 ± 0.74	63.65 ± 1.98	16.25	0.000
0	16	24.49 ± 3.21	36.69 ± 0.99	61.24 ± 3.01	17.21	0.000
20	16	30.09 ± 0.97	57.19 ± 2.50	75.14 ± 3.31	20.16	0.000

注:各时间点比较依次为 24、48、72 h

2.4 吉非替尼与氟尿嘧啶联合作用的 q 值 见表 2。吉非替尼与氟尿嘧啶合用 24 h 未显示相加作用,而在 48 与 72 h 各浓度组合均显示出相加作用。其中在 48 h 吉非替尼 10 $\mu\text{g/mL}$ 和氟尿嘧啶

8 $\mu\text{g/mL}$ 联合用药组 q 值最大,为 1.01,72 h 有所下降为 0.92,但仍高于其他两组 q 值。

3 讨论

在 2002 年,食道癌已经是第六大肿瘤相关性

表 2 吉非替尼与氟尿嘧啶对食道癌细胞联合作用的 q 值

吉非替尼 + 氟尿嘧啶 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	时间(h)		
	24	48	72
5 + 4	0.75	0.85	0.88
10 + 8	0.73	1.01	0.92
20 + 16	0.66	0.85	0.87

的死亡原因,而且每年全球仍有 462 000 新增病例^[8],其 5 年生存率低于 20%^[9]。食道癌的姑息性化疗并未显示出优势,EGFR 抑制剂在食道癌中的使用报道较多,比如西妥昔单抗、吉非替尼、厄洛替尼、曲妥珠单抗等^[10]。目前已有关于将吉非替尼作为食道癌患者二线治疗的临床研究,结果证实是有效的^[11]。已经发现 EGFR 过度表达影响食道癌局部肿瘤进展情况,淋巴结的转移数量,放化疗的敏感性^[12]。因此 EGFR 抑制剂与化疗或者放疗合用可能会更加有效。Taira 等^[7]发现吉非替尼联合放疗对食道癌细胞株的抗增殖作用具有协同作用,吉非替尼对放疗有增敏作用。那么吉非替尼与氟尿嘧啶合用后对食道癌作用是怎样的呢?

本研究结果显示单用吉非替尼、氟尿嘧啶对食道癌细胞均有抑制作用,且具有浓度时间依赖性。吉非替尼在到达一定浓度后,再提升浓度并没有增加对肿瘤细胞的抑制作用,氟尿嘧啶并未出现这样的趋势。通过软件计算发现吉非替尼的 IC_{50} 为 $22.14 \mu\text{g}/\text{mL}$,氟尿嘧啶为 $28.02 \mu\text{g}/\text{mL}$,我们选择 IC_{50} 值以下的组合为合用组,通过实验发现联合用药组对食道癌细胞的抑制率均高于两个单药组,表明二者联用对细胞的抑制作用明显强于相同剂量的单药。通过计算联合用药后 q 值,发现吉非替尼与氟尿嘧啶合用后并未出现协同作用,表现为相加作用。两药合用组在 24 h 并未出现疗效明显增加,而在 48、72 h 均表现为疗效的增加。其中氟尿嘧啶 $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ 与吉非替尼 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 联合用药组, q 值在 48、72 h 均高于其他合用组,且在 48 h 是 q 值达到最大(1.01)。虽然在试验剂量范围内,单药组存在药效-剂量依赖性关系,但是高浓度及低浓度并不是最佳联合剂量浓度,而在两药 IC_{25} 值附近的组合为最佳组合。其机制可能与两种药物特性有关,吉非替尼将细胞周期阻滞与 G_0/G_1 期,而氟尿嘧啶属于细胞周期特异性药物,主要杀灭 S 期细胞,但它又能以伪代谢物的形式插入 RNA 中影响其功能,因此对增殖细胞各期都有一定的影响。本研究表明在取得相同疗效的前提下,联合应用可以减少化疗药物的剂量,并因而可能减少其相应的不良反应。目前有关 EGFR 抑制剂

与化疗合用对食道癌的疗效问题,研究报道不多。Lorenzen 等^[13]所进行的一项食道癌二期临床试验即西妥昔单抗与 CF 方案(氟尿嘧啶+顺铂)合用和单用 CF 方案的比较,结果发现合用后除了皮疹与腹泻的几率有所增加,其 3/4 级化疗后毒副反应并未增加,按 resist 评价标准,肿瘤的控制率、疾病无进展生存期、总生存期均高于单用 CF 组。最后得出结论西妥昔与化疗合用是安全的,同时可以提高化疗的效率。已有研究表明吉非替尼与放疗联合治疗食道癌,可以提高放疗的敏感性。本研究也证实吉非替尼联合化疗药物后抗增殖疗效增加,因此我们认为亦可将 EGFR 抑制剂吉非替尼与化疗药物合用作为食道癌患者生物化疗模式,但是更多的证据仍需临床循证医学依据。

4 参考文献

- [1] Gibson M K, Abraham S C, Wu T T, et al. Epidermal growth factor receptor, p53 mutation, and pathological response predict survival in patients with locally advanced esophageal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy [J]. Clin Cancer Res, 2003,9(17):6461-6468.
- [2] Chakravarti A, Dicker A, Mehta M. The contribution of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway to radioresistance in human gliomas: a review of preclinical and correlative clinical data [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004,58(3):927-931.
- [3] Contessa J N, Abell A, Valerie K, et al. ErbB receptor tyrosine kinase network inhibition radiosensitizes carcinoma cells [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006,65(3): 851-858.
- [4] Chong G, Cunningham D. The role of cetuximab in the therapy of previously treated advanced colorectal cancer [J]. Semin Oncol, 2005,32(6 Suppl 9):S55-58.
- [5] Zhang W, Gordon M, Lenz H J. Novel approaches to treatment of advanced colorectal cancer with anti-EGFR monoclonal antibodies [J]. Ann Med, 2006,38(8):545-51.
- [6] Raben D, Helfrich B, Chan D C, et al. The effects of cetuximab alone and in combination with radiation and/or chemotherapy in lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2005,11(2 Pt 1):795-805.
- [7] Taira N, Doihara H, Oota T et al. Gefitinib, an epidermal growth factor receptor blockade agent, shows additional or synergistic effects on the radiosensitivity of esophageal cancer cells in vitro [J]. Eur J Surg Oncol, 2007,33(1):44-48.
- [8] Parkin D M, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002 [J]. CA Cancer J Clin, 2005,55(1):74-108.
- [9] Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics 2005 [J]. CA Cancer J Clin, 2005,55(1):10-30.
- [10] Homs M Y, Voest E E, Siersema P D. Emerging drugs for esophageal cancer [J]. Expert Opin Emerg Drugs, 2009,14(2):329-339.
- [11] Janmaat M L, Gallegos-Ruiz M I, Rodriguez J A, et al. Predictive factors for outcome in a phase II study of gefitinib in second-line treatment of advanced esophageal cancer patients [J]. Clin Oncol, 2006,24(10):1612-1619.

[12] Gotoh M, Takiuchi H, Kawabe S, et al. Epidermal growth factor receptor is a possible predictor of sensitivity to chemoradiotherapy in the primary lesion of esophageal squamous cell carcinoma [J]. Jpn J Clin Oncol, 2007,37(9): 652-657.

[13] Lorenzen S, Schuster T, Porschen R, et al. Cetuximab plus

cisplatin-5-fluorouracil versus cisplatin-5-fluorouracil alone in first-line metastatic squamous cell carcinoma of the esophagus; a randomized phase II study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie [J]. Ann Oncol, 2009,20(10):1667-1673.

(收稿:2010-07-04 编辑:王耀东)

双侧声带固定患者行气管插管全身麻醉 1 例

于丽云 谭刚 张秀华

患者男,30岁,体重60kg,主因活动后气喘伴喉鸣,症状进行性加重,伴咳嗽2周入院。患者幼时因外伤致失语,能发声,但不能正常语言交流。1年前于外院在区域神经阻滞麻醉下行甲状腺肿物切除术,术后未出现声音嘶哑及呼吸困难等情况。纤维喉镜检查示:双侧声带固定,声门裂约2~3mm,其余鼻咽、喉咽组织结构未见异常,声门下方未窥及。颈部B超示甲状腺多发实性及囊实性结节。外院胸片示:双肺未见明显异常,气管未见明显受压及移位。其他实验室检查未见明显异常。查体,患者静卧时呼吸浅快,呈I度呼吸困难,鼻导管吸氧2L/min,SpO₂≥97%,双肺呼吸音粗,未闻及干湿啰音。加大吸入氧流量,嘱患者深呼吸SpO₂可达100%。张口度正常,Mallampati评分为I级,甲颈距离>6cm且颈部活动正常。

患者需要建立人工气道,计划先行气管插管,再做气管切开。患者入手术室后予面罩吸氧去氮5min,SpO₂达100%,静脉依次注入芬太尼50μg,丙泊酚160mg,琥珀酰胆碱60mg,1min后直接喉镜检查,可清晰显露声门,声门裂较前明显增宽,选择ID7.0号气管导管,导管外壁充分润滑,将导管尖端斜面与声门裂长轴平行,从声门裂正中插入,管壁触及声带可推开,无明显声带紧张现象,导管进入气管无阻力,插管成功。余麻醉过程顺

利。行甲状腺肿物切除及气管切开术,病理结果示甲状腺滤泡癌。患者于外院行甲状腺癌根治术,术后呼吸功能逐渐恢复,气管造口也已封闭。但患者拒绝再作喉镜检查,故声带运动恢复情况不得而知。

讨论 气管切开术用于各种原因引起的上呼吸道梗阻致呼吸困难的患者,手术时间约10min。本例患者因双侧声带固定致呼吸困难,符合气管切开术的指征,但由于甲状腺结节的存在,可能导致气管显露困难,出血多,手术时间长,患者缺氧的风险大,因此计划先试行气管插管,再做气管切开。

该患者呼吸困难的原因为双侧声带固定致声门狭窄。双侧声带固定,可见于咽喉部结构异常和喉返神经麻痹。咽喉部结构异常主要见于双侧勺状软骨固定,既往长期(>3d)气管插管史是双侧勺状软骨固定的常见原因,常并发声门下和(或)气管狭窄。此类声带固定对肌松剂反应欠佳,往往存在插管困难。喉返神经麻痹主要由甲状腺手术引起,也见于气管插管、恶性肿瘤及神经源性疾病,部分病因不明,但通常不伴有其他部位狭窄。喉返神经麻痹并不表示勺状软骨僵硬不动,除了双侧喉返神经完全麻痹伴双侧或一侧喉上神经完全麻痹时,可出现双侧或一侧勺状软骨完全固定,其他各种喉神经麻痹时,勺状软骨仍可以微动;即使喉返神经长时间麻痹(>6个月),也不会造成环杓关节僵硬,而且喉返神经支配达50%时,声带即可恢复运动。因此,对于喉返神经麻痹引起的声带固定,给予肌松剂后可能使喉内肌松弛,声门部分开放,便于气管插管。具体到此患者,病史只

有2周,且无喉部损伤的病史,其声带固定的主要原因可能是肿瘤浸润或压迫双侧喉返神经导致的神经麻痹,不伴有其他咽喉部结构异常,而且患者不存在其他困难插管的因素,因此麻醉选择静脉快速诱导,直接喉镜明视气管插管技术。

插管全程中,力争每一步都确保患者的安全。麻醉诱导前备好气管切开包,要求耳鼻喉科医生在场。诱导时充分吸氧去氮,提高患者氧储备。麻醉药物选择短效的丙泊酚,肌松剂选择小剂量琥珀酰胆碱(1mg/kg),这样一旦插管困难,患者可迅速清醒及恢复自主呼吸,另外,琥珀酰胆碱可使咽喉部小肌群最先松弛,有助于声带外展。选择直接喉镜明视插管,一方面是为了观察麻醉后声门开放程度,选择合适型号气管插管,另一方面直视下插管可以调整气管导管的角度,降低损伤声带的风险。而纤维支气管镜虽然便于观察声门及声门下结构,对气道的刺激也比直接喉镜小,但是导管通过狭窄声门时的情况不能监测,存在声带损伤的风险,所以不适于声带固定的患者。

双侧声带固定的患者,若伴有咽喉部结构异常,往往经口气管插管困难,需急行气管切开。单纯由双侧喉返神经麻痹引起的声带固定,可试行经口气管插管。对于此例患者,根据其病史,麻醉前后声门情况,以及肿瘤切除术后呼吸功能恢复情况,表明声带固定的原因主要是肿瘤压迫致喉返神经麻痹。采用快速诱导直接喉镜明视气管插管,可使声带部分松弛,便于插管,降低声带损伤的风险,是此类手术麻醉的较佳选择。

(收稿:2010-08-14 编辑:袁宇)

doi:10.3969/j.issn.1006-5725.2011.03.009

作者单位:100073 北京电力医院(于丽云);100730 北京市,中国医学科学院,北京协和医学院,北京协和医院麻醉科(谭刚,张秀华)